

3 种根管封闭剂抗微生物作用的体外评价

刘 佳¹, 白宇宏^{1△}, 宋英民² (1. 河北联合大学口腔医学院口腔内科, 河北唐山 063000;
2. 河北省承德市口腔医院 067000)

【摘要】 目的 观察比较 3 种不同封闭剂的体外抑菌性能: 氧化锌丁香油封闭剂、环氧树脂类封闭剂(下称 AH Plus)、生物陶瓷类封闭剂(下称 iRoot SP)的体外抑菌性能。**方法** 采用琼脂扩散法, 选取粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌作为实验菌种。在 37 ℃ 温箱观察 24 h 后检测各组材料抑菌环的大小, 评估其抗微生物的作用。**结果** 氧化锌丁香油组对于 3 种实验菌均有良好的抑制作用, 产生的抑菌区域极显著于 AH Plus 组及 iRoot SP 组($P < 0.01$)。AH Plus 组与 iRoot SP 组对于粪肠球菌差异有统计学意义($P < 0.01$); 对白色念珠菌抑菌效果差异有统计学意义($P < 0.05$); 对于金黄色葡萄球菌抑菌效果差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** iRoot SP 虽然具备了一个优良封闭剂所需的诸多优点, 但琼脂扩散实验显示其抑菌性能方面还有待加强。

【关键词】 根管封闭剂; 琼脂扩散实验; 抗微生物作用

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.08.016 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)08-1068-02

The evaluation of the antimicrobial activity with three endodontic sealers in vitro LIU Jia¹, BAI Yu-hong^{1△}, SONG Ying-min² (1. Department of Oral Medicine, College of Stomatology, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Stomatological Hospital in Chengde, Chengde, Hebei 067000, China)

【Abstract】 Objective To observe antimicrobial activity of three types of root canal sealers. **Methods** Agar diffusion test. We selected Enterococcus faecalis (E. faecalis), Staphylococcus aureus (S. aureus), Candida albicans (C. albicans), as experimental strains. We put these strains in an incubator at 37 ℃. After 24 hours, we observed the radius of bacteriostatic circle of Zinc Oxide Eugenol sealer (ZOE); AH Plus and iRoot root canal sealing paste (iRoot SP), respectively. **Results** ZOE has good inhibitory effect on the three kinds of experimental bacteria, while the region has a highly significant statistical inhibition than AH Plus and iRoot SP ($P < 0.01$). there were extremely statistical difference for E. faecalis among the zones of inhibition of microbial growth of AH Plus and iRoot SP ($P < 0.01$); there also have statistical difference for C. albicans among AH Plus and iRoot SP ($P < 0.05$); No statistical difference for S. aureus antibacterial effect ($P > 0.05$). **Conclusion** Antibacterial performance of new type of biological ceramic material iRoot SP needs to be strengthened by ADT experiments showing.

【Key words】 root canal sealer; agar diffusion test; antimicrobial activity

完善的根管治疗是通过彻底的根管清创、根管灭菌以及完善的根管充填来完成的, 然而经过严格的消毒还会存留一些微生物在根管系统中, 是成为根管再感染的主要原因^[1]。理想的根管封闭剂应具备良好的抗菌活性, 其可以消除根管剩余的细菌, 防止再感染^[2]。临床上的根管封闭剂种类很多, 常用的氧化锌类具有良好的抑菌性, 但是其封闭性、生物活性较差, 细胞毒性较高^[3]。AH Plus 是近年出现的新型环氧树脂类根管封闭剂, 具有体积稳定、流动性好、通过释放低浓度的甲醛而抗菌等优点。iRoot SP 是近几年被引入牙体牙髓的一种新型生物陶瓷材料, 主要作为根管封闭剂和侧穿修补材料^[4]。其具有良好的生物相容性、抗菌活性、X 线阻射性和碱性 pH 值。因此, 本研究的目的是采用琼脂扩散法, 培养白色念珠菌、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌作为实验菌种, 对 3 种根管封闭剂: 氧化锌丁香油封闭剂、AH Plus、iRoot SP 的抗菌作用进行评价, 为临床治疗选择合适的根管封闭剂提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 一般资料 氧化锌丁香油封闭剂(武汉朗力生物公司), AH Plus 封闭剂(德国登士柏公司), iRoot SP 封闭剂(Innovative BioCreamix Inc, Vancouver, 加拿大)。

1.2 仪器与试剂 标准菌株粪肠球菌(ATCC 29212)、金黄色

葡萄球菌(ATCC 25923)、白色念珠菌(ATCC 10231)(温州市康泰生物科技有限公司), 超净工作台, 无菌培养皿, 脑心浸液(BHI)培养基(北京陆桥生物技术责任有限公司), 游标卡尺, 直径为 4 mm 的金属管模具。

1.3 方法 将试验菌株粪肠球菌 ATCC 29212、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、白色念珠菌 ATCC 10231 分别于 37 ℃ 恒温复苏培养, 使用分光光度计将菌液浓度调至为 1.5×10^8 CFU/mL 备用。试验分三组, 试验组: AH Plus 组、iRoot SP 组; 对照组: 氧化锌丁香油组。为了使封闭剂体积相同, 在无菌操作条件下, 制备 BHI 琼脂培养皿, 琼脂厚度约为 4 mm, 分别取上述 3 种菌悬液 200 μ L 铺菌。用直径为 4 mm 的金属管模具在每个铺好实验菌培养皿上打 3 个孔(孔径 4 mm, 深 4 mm), 然后, BHI 琼脂培养基将孔底封闭以防止封闭剂在培养基与培养皿之间扩散。之后将 3 种封闭剂严格按厂家说明书要求调制后放入孔内。室温下放置 2 h, 以便扩散。将培养皿放入 37 ℃ 温箱, 培养 24 h 取出。观察抑菌区域, 抑菌区域为封闭剂的最外缘与细菌生长的最内缘之间的最短距离, 测定 3 次, 取平均值。精确到 0.01 mm, 取平均值, 重复做 5 次。

1.4 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行单因素方差分析(ANOVA 和 LSD-*t* 检验)。

作者简介: 刘佳, 女, 医师, 硕士, 主要从事牙体牙髓疾病的研究。

△ 通讯作者, E-mail: 518uu@sina.com。

$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 粪肠球菌抑菌性 氧化锌丁香油组与 AH Plus 组、iRoot SP 组比较,粪肠球菌抑菌性差异有统计学意义($P<0.01$); AH Plus 组与 iRoot SP 组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。具体见表 1。

2.2 金黄色葡萄球菌抑菌性 氧化锌丁香油组与 AH Plus 组、iRoot SP 组比较,金黄色葡萄球菌抑菌性差异有统计学意义($P<0.01$);AH Plus 组与 iRoot SP 组比较,金黄色葡萄球菌抑菌性差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.3 白色念珠菌抑菌性 氧化锌丁香油组与 AH Plus 组、iRoot SP 组比较,白色念珠菌抑菌性差异有统计学意义($P<0.01$);AH Plus 组与 iRoot SP 组比较,白色念珠菌抑菌性差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 3 种根管封闭剂体外抑菌比较($\bar{x}\pm s$,mm)

封闭剂	粪肠球菌	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌
氧化锌丁香油	7.90±0.22	8.06±0.84	11.42±0.63
iRoot SP	—	1.60±0.45	3.58±0.64
AH Plus	1.92±0.25	1.56±0.43	2.62±0.60

注:—表示无数据。

3 讨 论

粪肠球菌及白色念珠菌是根管继发性感染或持续性感染的主要致病菌,以至于导致治疗的失败^[5]。而金黄色葡萄球菌是导致根管原发性感染的主要致病菌。粪肠球菌常定植在根管中,可以长期饥饿生存。Figdor 等^[6]认为,粪肠球菌在缺乏营养的根管长期忍受饥饿是导致根管治疗失败原因之一。白色念珠菌常与粪肠球菌同时存在于根管中的牙本质小管内,对多种根管消毒药物有抵抗作用^[7]。因此,根管封闭剂的抑菌性在整个根管治疗中同样起着至关重要的意义。

氧化锌丁香油封闭剂是以氧化锌和丁香酚为主要成分的根管封闭剂,由粉剂及液剂组成。粉剂主要成分是氧化锌、麝香草酚、碘仿等;液剂为丁香油,其中有较强的抑菌、杀菌、防腐作用的成分是丁香油酚及麝香草酚,对口腔多数致病菌均有不同程度的抑制作用。本试验结果也显示,氧化锌丁香油封闭剂在 3 种根管封闭剂中其抑菌性能最强,对粪肠球菌等 3 种微生物均具有一定的抑制作用,这主要是由于丁香油等抑菌成分所致,虽然具有良好抑菌性但同时也有很强的细胞毒性,也可以刺激根尖组织。Leonardo 等^[8]发现,固化的氧化锌丁香油封闭剂仍可释放甲醛等物质,使其具有高细胞毒性,诱导有机体突变及致癌性^[9]。

新型环氧树脂类根管封闭剂 AH Plus 是 AH26 的改良形式,甲醛较 AH26 的浓度少,具有良好的生物相容性、X 射线阻射性、流动性及低溶解性。体外抑菌琼脂扩散实验中,学者 Farmakis 等^[10]研究表明,AH Plus 对兼性厌氧粪肠球菌有较低的抑制作用。Yasuda 等^[11]研究表明,AH Plus 对兼性厌氧粪肠球菌、真菌白色念珠菌、需氧菌金黄色葡萄球菌及大肠杆菌有抑制作用;直接接触法试验中。Saleh 等^[12]证实,AH Plus 对粪肠球菌有一定的抑制作用。本试验也显示,相对于氧化锌丁香油封闭剂而言,AH Plus 的抑菌性能明显降低,但是对于试验菌有一定的抑菌性,这可能是由于其释出较少甲醛量有关。

新型的生物陶瓷材料 iRoot SP 主要含有硅酸钙、氧化锆、氧化钽、一价硅酸钙和填料,主要用做根管封闭和侧穿底穿的

修补^[4]。Alanezi 等^[13]研究表明,其良好的生物相容性与 MTA 相似且无致癌作用。iRoot SP 因含有氢氧化钙,氢氧化钙溶液显强碱性,所以杀菌作用明显。Zhang 等^[14]接触试验表明,iRoot SP 较 AH Plus 杀灭所有粪肠杆菌所需时间短且持续时间长。由此可见,iRoot SP 对感染根管具有更强的抗菌性。另有试验表明,在细菌培养液中加入阿莫西林,iRoot SP 对粪肠球菌的抑菌性会更好^[15]。这可能与培养液中较高的 pH 值、氢氧化钙有关^[14]。

本试验中选用的是琼脂扩散法,这是在离体试验中检测和评价根管封闭剂的抗微生物作用的最常用方法,这种方法可以直接比较各种测试材料与待测菌的抗微生物作用,但其抑菌性能会受到材料在琼脂内扩散性以及溶解度亲和力等因素的影响,其封闭剂的抑菌性能还有待研究^[16-18]。

参考文献

[1] Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 2002, 13(2): 171-183.

[2] Nawal RR, Parande M, Sehgal R, et al. A comparative evaluation of antimicrobial efficacy and flow properties for Epiphany, Guttaflow and AH-Plus sealer[J]. Int Endod J, 2011, 44(4): 307-313.

[3] 徐爱凤, 张琛, 侯本祥. 不同根管封闭剂根管充填术后疼痛的临床研究[J]. 北京口腔医学, 2005, 13(2): 108-110.

[4] Hess D, Solomon E, Spears R, et al. Retreatability of a bioceramic root canal sealing material[J]. J Endod, 2011, 37(11): 1547-1549.

[5] Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, et al. Enterococcus faecalis in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006, 102(2): 247-253.

[6] Figdor D, Davies JK, Sundquist G, et al. Starvation survival, growth and recovery of enterococcus faecalis in human serum[J]. Oral Microbiol Immunol, 2003, 18(4): 234-239.

[7] Richards D, Davies JK, Figdor D. Starvation survival and recovery in serum of Candida albicans compared with Enterococcus faecalis[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010, 110(1): 125-130.

[8] Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Filho MT, et al. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1999, 88(2): 221-225.

[9] Huang FM, Chou LS, Chou MY, et al. Protective effect of NAC on formaldehyde-containing-ZOE-based root-canal sealers-induced cyclooxygenase-2 expression and cytotoxicity in human osteoblastic cells[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005, 74(2): 768-773.

[10] Farmakis ET, Kontakiotis ES, Tseleni-kotsoyili A, et al. Comparative in vitro antibacterial activity of six root canal sealers against Enterococcus faecalis and Proteus vulgaris[J]. J Invest Clin Dent, 2012, 3(4): 271-275.

[11] Yasuda Y, Kamaguchi A, Saito T. In vitro (下转第 1073 页)

物刺激、免疫法以及胆管结扎等,CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化是经典动物模型^[8]。本研究通过间隔腹腔注射 CCl₄ 诱导肝纤维化,通过 HE 与 Masson 染色检测炎性反应及胶原合成,确定肝纤维化模型是否建立成功。结果表明 CCl₄ 注射组的小鼠炎性反应程度及胶原合成显著高于正常组,说明本试验肝纤维化模型的建立是成功的。另外,HE 染色也证明正常小鼠肝脏内部没有炎性反应、肝小叶排列正常,说明 CCl₄ 的溶解液(橄榄油)和质粒的缓冲液,腹腔注射及尾静脉高压注射等实验操作不影响纤维化的发生。

成纤维细胞是肝纤维化细胞外基质的主要来源细胞,HSC 是肌成纤维细胞的主要来源细胞^[9]。目前抗纤维化基因治疗有了初步发展,但基因治疗缺乏细胞选择性,可能会引起其他组织细胞的损害。为了减少不良反应,必须选择目的基因在肝脏 HSC 中特异表达的方法。目前有 TIMP1、CSRP2、SM22alpha 启动子能使基因在 HSC 中特异表达,但仍不够理想^[10]。近来 GFAP 被认为是 HSC 特异表达的标志蛋白。因此,本研究采用尾静脉高压注射裸质粒的方法将 pCDNA3.1-mGFAP-p-EGFP 瞬时转染到肝纤维化小鼠肝脏中。这种转染方法是一种有效的、肝脏特异性的基因转移方法,通过瞬时注射大剂量的裸质粒将外源基因转染到动物的肝组织,裸质粒在肝细胞内瞬时表达,不会对肝脏产生长期干扰,已广泛用于外源基因的表达变化对肝脏疾病发生、发展影响的研究^[11]。通过荧光显微镜检测 EGFP 绿色荧光验证转染效果,转染 pCDNA3.1-mGFAP-p-EGFP 质粒的小鼠肝脏绿色荧光强度显著高于转染 pCDNA3.1-mGFAP-p 对照质粒的小鼠,说明 GFAP 启动子能使 EGFP 在肝脏组织中高效表达。EGFP 与星状细胞标志蛋白共定位实验结果显示,绿色荧光的 EGFP 与显示为红色荧光的 DESMIN 和 α -SMA 大部分重合在一起,说明 EGFP 主要在 HSC 中表达,进一步提示 GFAP 启动子能够调控外源基因可以在体内靶向 HSC,因此,GFAP 启动子介导体内靶向 HSC 治疗策略具有临床应用的潜力。

参考文献

[1] Liu X,Xu J,Brenner DA,et al. Reversibility of liver fibrosis and inactivation of fibrogenic myofibroblasts[J]. Curr Pathobiol Rep,2013,1(3):209-214.

(上接第 1069 页)

evaluation of the antimicrobial activity of a new resin-based endodontic sealer against endodontic pathogens[J]. J Oral Sci,2008,50(3):309-313.

[12] Saleh IM,Ruyter IE,Haapasalo M,et al. Survival of Enterococcus faecalis in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro[J]. Int Endod J,2004,37(3):193-198.

[13] Alanezi AZ,Jiang J,Safavi KE,et al. Cytotoxicity evaluation of endosequence endosequence root repair material[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,2010,109(3):122-125.

[14] Zhang H,Shen Y,Ruse ND,et al. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against Enterococcus faecalis[J]. J Endod,2009,35(7):1051-

[2] Tacke F,Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol,2012,6(1):67-80.

[3] Su TH,Kao JH,Liu CJ. Molecular mechanism and treatment of viral hepatitis-related liver fibrosis[J]. Int J Mol Sci,2014,15(6):10578-10604.

[4] Cheng K,Yang NN,Mahato RI. TGF- β ₁ gene silencing for treating liver fibrosis[J]. Mol Pharm,2009,6(3):772-779.

[5] Chen SW,Chen YX,Zhang XR,et al. Targeted inhibition of platelet-derived growth factor receptor-beta subunit in hepatic stellate cells ameliorates hepatic fibrosis in rats[J]. Gene Therapy,2008,15(21):1424-1435.

[6] Puche JE,Lee YA,Jiao J,et al. A novel murine model to deplete hepatic stellate cells uncovers their role in amplifying liver damage in mice[J]. Hepatology,2013,57(1):339-350.

[7] Yang NN,Mahato RI. GFAP promoter-driven RNA interference on TGF- β ₁ to treat liver fibrosis[J]. Pharm Res,2011,28(4):752-761.

[8] Weiler-Normann C,Herkel J,Lohse AW. Mouse models of liver fibrosis[J]. Z Gastroenterol,2007,45(1):43-50.

[9] Fallowfield JA. Therapeutic targets in liver fibrosis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2011,300(5):709-715.

[10] Herrmann J,Arias M, Van De Leur E,et al. CSRP2, TIMP-1, and SM22alpha promoter fragments direct hepatic stellate cell-specific transgene expression in vitro, but not in vivo[J]. Liver Int,2004,24(1):69-79.

[11] Xu W,Wang LW,Shi JZ,et al. Effects of RNA interference targeting transforming growth factor-beta 1 on immune hepatic fibrosis induced by Concanavalin A in mice[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int,2009,8(3):300-308.

(收稿日期:2014-11-15 修回日期:2014-12-10)

1055.

[15] Baer J,Maki JS. In vitro evaluation of the antimicrobial effect of three endodontic sealers mixed with amoxicillin[J]. J Endod,2010,36(7):1170-1173.

[16] 徐辉碧. 纳米医药[M]. 北京:清华大学出版社,2004:2.

[17] Estrela C,Bammann LL,Estrela CR,et al. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal[J]. Braz Dent J,2000,11(1):3-9.

[18] Morgental RD,Vier-Pelisser FV,Oliveira SD,et al. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers[J]. Int Endod J,2011,44(12):1128-1133.

(收稿日期:2014-11-06 修回日期:2014-11-22)